

図2. Hy64-IgM の U1-70K/A/C 抗原に対する反応性

NHS (健常人血清)、抗 U1RNP/U1-70K 抗体陽性血清 (KM、OC)、抗 U1RNP/U1-C 抗体陽性血清 (YK) をはじめにウェルに加えて 2 時間以上静置した後、Hy64-IgM を加え、さらにアルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgM 抗体を加えて pNPP で発色させた。

total U1-RNP (U1-RNA、70K、A、C 蛋白) を固相化した ELISA プレートを用いた。NHS や YK 血清では U1RNP に対する反応は阻害されず、KM、OC 血清で阻害された。

U1-70K、A、C 抗原を固相化した ELISA プレートを用いた。A と同様の反応が U1-70K ELISA でより明確に認められたが、U1-A および U1-C 抗原では認められなかった。

混合性結合組織病(MCTD)にともなう肺高血圧(PH)に関連する  
抗内皮細胞抗体(AECA)に関する研究

分担研究者： 澤井高志 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 教授  
研究協力者： 鎌滝章央 岩手医科大学医学部 病理学第一講座 助教  
佐々木信人 岩手医科大学医学部 内科学第三講座 助教  
畠山 明 東北労災病院 リウマチ膠原病科 部長

研究要旨

混合性結合組織病（MCTD）に合併する肺高血圧症（PH）は、MCTD 患者の死因の重要な位置を占めるが、その発症機序はいまだ明らかになっていない。PH 発症に至る初期変化として肺微小血管内皮細胞傷害が示されているため、本研究では肺微小血管内皮細胞を傷害する要因として、血清因子の一つである抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）に焦点をあて、研究を行った。AECA の抗原を二次元電気泳動とウエスタンブロット、質量分析を用いた解析により探索した結果、約 20 の抗原候補蛋白質を得ることができ、その中には U1snRNP70K や hnRNPA1 も含まれていた。

A. 研究目的

混合性結合組織病（MCTD）患者では、他の膠原病患者に比べ高率に発症する肺高血圧症（PH）が死因の重要な位置を占めているが、その発症要因は不明である。本研究の目的は MCTD における PH の発症機序の解明である。本研究室での病理組織学的検討から、臨床的には PH を示していない MCTD 患者でも肺の小血管を中心に血管内皮細胞傷害に起因する病変が発生していることが明らかになっており、小血管の傷害から徐々に進行して PH 発症に至ることが示唆されている<sup>1)2)</sup>。また、PH を発症 MCTD 患者血清が肺微小血管内皮細胞に対して、高い反応性を示すことも明らかになっている<sup>3)</sup>。本研究において、我々は、MCTD 患者血清中の抗内皮細胞抗体（anti-endothelial cell antibody, AECA）による肺微小血管内皮細胞の傷害や機能変化が PH 発症の原因であると考え、MCTD 患者血清中の AECA について解析した。

B. 研究方法

AECA の抗原候補蛋白質を同定するため、肺微

小血管内皮細胞から調製した蛋白質を二次元電気泳動で展開し、PVDF 膜に転写後、健常者血清や MCTD 患者血清から精製した IgG を用いてウエスタンブロットを行った（2D ウェスタン）。MCTD 患者の血清に強く反応したスポットをゲルから切り出し、ペプチドマスフィンガープリンティング法を用いて、各々の蛋白質を同定した。同定できなかったスポットについては LC-MS/MS で再度同定を試みた。同定できた抗原候補の組換え蛋白質を作製し、血清の反応性をウエスタンブロットにより確認した

（倫理面への配慮）

採血にあたっては、提供者に使用目的、データ管理について説明し、同意の得られた場合にのみサンプルの提供をうけた。提供者のデータの管理については研究中、研究終了後を問わずに厳重に行い、解析時や発表時には検体番号で扱い、個人名が第三者に知られないように配慮した。

C. 研究結果

2D ウェスタンの結果、MCTD 患者血清に強く反応するスポットを約 20 個選択できた (図)。約半数を MALDI-TOF MS を用いたペプチドマスマフィンガープリンティングで同定でき、残りについては、LC-MS/MS で同定を試みた。同定できた AECA の抗原候補蛋白質は、U1snRNP70K、hnRNPA1、hnRNPL、hnRNPQ、GAPDH、vimentin、annexin A1 などであった。

#### D. 考察

同定できた蛋白質の中に、MCTD の特徴である U1snRNP70K や、RA と SLE と MCTD で自己抗体の報告のある hnRNPA1<sup>4)</sup>が含まれていた。また、近年、hnRNPL に対する抗体は hnRNPA1 に対する自己抗体をもつ患者に認められることが多いという報告<sup>5)</sup>があることから、MCTD 患者血清中に hnRNPL に対する抗体が存在する蓋然性は高い。これらのことは、二次元電気泳動とウェスタンブロットを用いた抗原候補の探索法が有用であり、抗原候補蛋白質の中に、MCTD 患者における PH 発症に関連する抗原が含まれている可能性を示している。

#### E. 結論

本研究により MCTD 患者血清中の自己抗体の抗原候補蛋白質を得ることができた。これらの抗原候補蛋白質が、肺微小血管内皮細胞に特異的に発現するか解析するとともに、PH 発症機序や病態との関連を明らかにしていくことで、新たな治療法や診断法の開発につながることを考える。

#### 参考文献

- 1) Sawai T, Murakami K, Kasukawa R and Kyogoku M. Histopathological study of mixed connective tissue disease from 32 autopsy cases in Japan. *Jpn J Rheumatology* 7: 279-292, 1997
- 2) 澤井高志、三上芳喜、吉村幸一. 混合性結合組織病における肺高血圧症の病理組織学的特徴. *リウマチ科* 8: 66-74, 1992
- 3) 佐々木信人、黒瀬頭、井上洋西、澤井高志. 混合性結合組織病に合併する肺高血圧症に対する

抗内皮細胞抗体の関与について. *リウマチ* 42(6): 885-894, 2002

- 4) Astaldi Ricotti GC, Bestagno M, Cerino A, Negri C, Caporali R, Cobianchi F, Longhi M, Maurizio Montecucco C. Antibodies to hnRNP core protein A1 in connective tissue diseases. *J Cell Biochem.* 40(1):43-7, 1989
- 5) Siapka S, Patrino-Georgoula M, Vlachoyiannopoulos PG, Guialis A. Multiple specificities of autoantibodies against hnRNP A/B proteins in systemic rheumatic diseases and hnRNP L as an associated novel autoantigen. *Autoimmunity.* 40(3):223-33, 2007

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chem Acta.* 387(1-2):55-8. 2007
- 2) Kitamura T, Kabuyama Y, Kamataki A, Homma MK, Kobayashi H, Aota S, Kikuchi SI, Homma Y. Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrin B1 system in rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294(1):C189-96. 2007
- 3) Watabe D, Kanno H, Yoshida A, Akasaka T, Sawai T. Adhesion of peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cells from the patients with psoriasis to cultured endothelial cells via the interaction between LFA-1 and ICAM-1. *Br. J. Dermatol.* 157(2):259-65. 2007
- 4) Kobayashi G, Fujita N, Noda Y, Ito K, Horaguchi J, Takasawa O, Obana T, Nakahara K, Uzuki M, Sawai T. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis forming a localized mass: a variant form of autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol.* 42(8):650-6. 2007
- 5) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：膠原病肺

の病理学的特徴. リウマチ科. 37(4): 392-398.

2007

6) 宇月美和、佐々木喜子、澤井高志：関節疾患の病理学的基礎. 臨床画像. 23(12): 1346-61.

2007

## 2.学会発表

1) 鎌滝章央、佐々木信人、澤井高志：混合性結合組織病に合併する肺高血圧症における抗内皮細胞抗体の解析. 第51回日本リウマチ学会総会・学術集会. 4月. 横浜 2007

2) 澤井高志、鎌滝章央：膠原病における肺高血圧症の病理学的特徴. 第8回肺高血圧症治療研究会. 6月. 東京 2007

3) 鎌滝章央、佐々木信人、畠山明、菅野祐幸、澤井高志. 混合性結合組織病(MCTD)に合併する肺高血圧症(PH)における肺血管内皮細胞傷害に関連する自己抗体の探索. 第12回血管病理研究会. 10月. 盛岡 2007

4) Kamataki A, Sasaki N, Hatakeyama A, Sawai T: Analysis of the serum reactivity against possible target proteins for anti-endothelial cell antibodies from sera of mixed connective tissue disease patients with pulmonary hypertension. American College of Rheumatology 71<sup>st</sup> Annual Scientific Meeting. Nov 6-11, 2007, Boston.

## H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 1. 特許取得

特になし。

### 2. 実用新案登録

特になし。

### 3. その他

特になし。

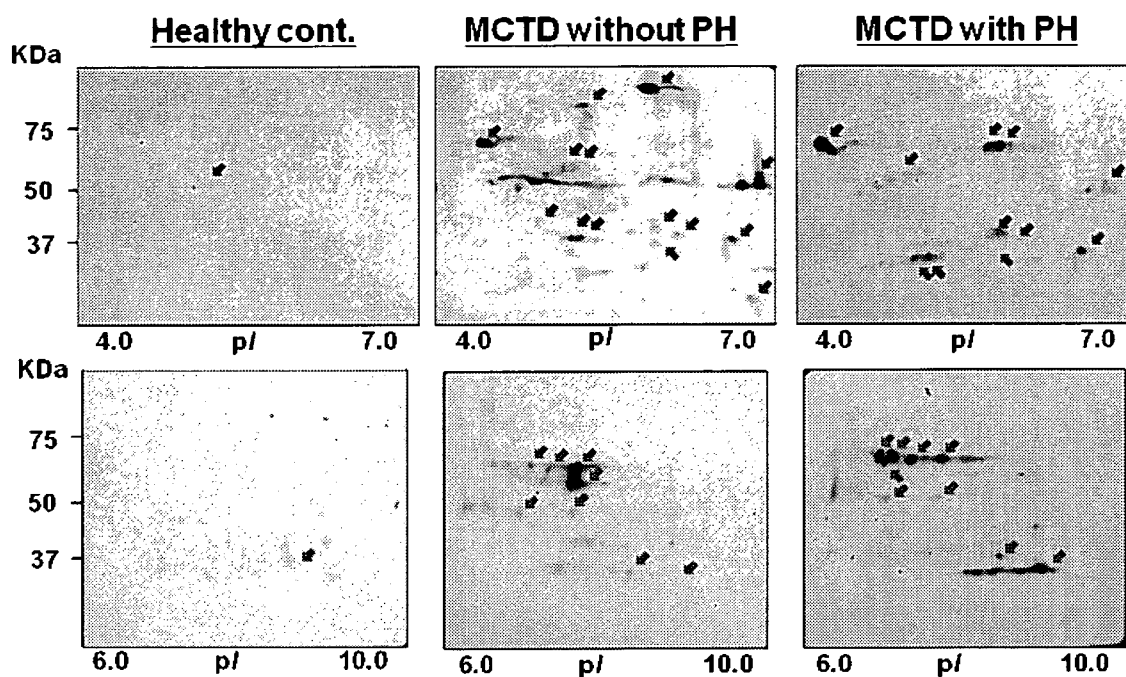


図. 肺微小血管内皮細胞から調製した蛋白質を用いた2D ウェスタンブロット法による患者血清と反応する蛋白質の検出

## 新規抗核抗体産生マウスモデルの検討

分担研究者： 川畑仁人 東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科・助教

### 研究要旨

混合性結合組織病は、抗核抗体である抗 RNP 抗体の出現を特徴としており、抗 RNP 抗体の出現機序の検討は、混合性結合組織病の病態解明に重要と考えられる。しかし、その解析に適した動物モデルを欠くため、前年度までにヌードマウスへの T 細胞移入による抗核抗体産生の系を樹立し、抗核抗体、特に抗 RNP 抗体の産生機序研究への有用性を明らかにした。そこで、本年度は、実際に本系を用いて、自己抗体産生の制御に関わる可能性が示唆されている細胞群および分子の抗 RNP 抗体産生への関与の検討を試みた。候補の細胞群として制御性 T 細胞を、分子としては Toll 様受容体 (TLR) を選択した。その結果、抗 RNP 抗体は、抗 dsDNA 抗体や抗 H+/K+ ATPase 抗体などと比べ、制御性 T 細胞の関与は少ないと考えられた。一方、RNA 受容体である TLR 7 を阻害することで著明に抗 RNP 抗体が低下したことから、抗 RNP 抗体産生に TLR7 が関与していることが示唆された。今後更に、核酸蛋白複合体である RNP に対する自己抗体産生に、核酸受容体がどのように関与しているか検討することは、本疾患の分子標的治療を開発する上で重要と考えられた。

### A. 研究目的

混合性結合組織病 (MCTD) は抗核抗体である抗 RNP 抗体の出現を特徴としており、抗 RNP 抗体の出現機序の検討は混合性結合組織病の病態解明に重要である。しかし、抗核抗体産生機序を検討するための動物モデルは限られ、かつその有用性は限定的であるため、前年度までに、早期に抗核抗体が誘導でき種々の条件で検討が可能な系の開発を行った。そこで、今回は、実際に本系を用いて、自己抗体産生の制御に関わる可能性が示唆されている細胞群および分子の抗 RNP 抗体産生への関与を明らかにすることを目的とし研究を行った。候補の細胞群として制御性 T 細胞を、分子としては TLR を選択した。

### B. 研究方法

#### (1) マウスへの抗核抗体誘導

抗核抗体をマウスに誘導するために、CD4<sup>+</sup>T 細胞や CD4 T 細胞サブセットを、ヌードマウスへ移入した。今回多数例の長期間にわたる観察、血清採取を行い、間接蛍光抗体法による抗核抗体の検討のほか、以下の自己抗体の検出を行っ

た。

#### (2) 抗 RNP 抗体及びその他自己抗体の検出

T 細胞移入をうけたヌードマウスに、ヒトにおける全身性自己免疫疾患に特徴的な抗核抗体が出現しているか検討した。特に、MCTD における抗核抗体として重要な抗 RNP 抗体を構成している抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-C 抗体について、その出現の有無や経時的変化などの検討を行った。また、抗 RNP 抗体の出現の特徴を明らかにするため、比較として SLE に特徴的な抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体、臓器特異的自己抗体として抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定も行った。

#### (2-1) 抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-C 抗体の検出

MCTD で認められる抗 RNP 抗体を構成する抗 U1RNP-70K 抗体および抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-C 抗体の出現の有無に関しては、市販のヒト U1RNP-70K リコンビナント蛋白およびヒト U1RNP-A リコンビナント蛋白、ヒト U1RNP-C リコンビナント蛋白を用いた ELISA

によって検討した。前年度までの研究により、実際にマウス U1RNP-A リコンビナント蛋白による ELISA や、イムノブロット、免疫沈降法などによりマウス蛋白に反応していることは確認している。

#### (2-2)抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体の検出

SLE に特徴的な抗ヌクレオソーム抗体および抗 dsDNA 抗体の有無に関しては、市販の ELISA キットを用いて検討した。

#### (2-3) 抗 H+/K+ ATPase 抗体の検出

臓器特異的自己抗体の一つである抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定は、市販のヒト H+/K+ ATPase リコンビナント蛋白を用いた ELISA によって検討した。

#### (3)抗 RNP 抗体産生における制御性 T 細胞の関与の検討

マウス脾細胞より MACS を用いて CD4<sup>+</sup>T 細胞や CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞、CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>制御性 T 細胞などの T 細胞サブセットを分離し、ヌードマウスに移入した。その後、経時的にレシピエントから血清採取を行い、抗 RNP 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定を行った。

#### (4)抗 RNP 抗体産生における TLR の関与の検討

自己抗体産生に関わる可能性が示唆される、核酸受容体である TLR、特に RNA 受容体である TLR7 と、DNA 受容体である TLR9 を検討の対象とした。これらを阻害する核酸やコントロール用の核酸を、ヌードマウスへの CD4+CD25-T 細胞移入時及び一週間ごとに投与し、経時的にレシピエントから血清採取を行った。それらの血清の抗 RNP 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗二本鎖 DNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体の測定を行った。

TLR7 を阻害する DNA、TLR9 を阻害する DNA、コントロール用の DNA とともに既に他グループから複数の論文で使用されているものである。TLR7 阻害 phosphorothioate DNA は IRS661、TLR9 阻害 phosphorothioate DNA は IRS869、

TLR7/9 阻害 phosphorothioate DNA は IRS954 として報告されているものである。また、阻害 DNA のレシピエントへの投与経路の検討はすでに他論文で検討されており、それをもとに腹腔内投与とした。

抗核抗体誘導時のための移入する細胞は CD4+CD25-T 細胞とした。これは、抗 RNP 抗体だけではなく、抗ヌクレオソーム抗体、抗二本鎖 DNA 抗体、抗 H+/K+ ATPase 抗体などが出現するため、各阻害 DNA がどの自己抗体の阻害効果をもたらしているか検討できると考え決定した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や実験は、大学動物実験施設規定に従い適切に行われている。

#### C. 研究結果

##### (1)抗 RNP 抗体産生への制御性 T 細胞の関与

抗 H+/K+ ATPase 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗 dsDNA 抗体は、CD4T 細胞から CD4+CD25+制御性 T 細胞を除去した CD4+CD25-T 細胞の移入群でのみ出現した。一方、抗 RNP 抗体は、CD4+CD25-T 細胞だけではなく、CD4T 細胞、CD4+CD25+T 制御性 T 細胞を移入した群でも、その発現を認めた。抗 RNP 抗体は、抗 U1RNP-70K 抗体、抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-C 抗体のいずれも認めることができた。各群は以下の特徴を認めた。

##### (1-1) CD4+CD25-T 細胞移入群

腸炎により約 2 ヶ月後から体重減少が出現し、約 3 ~ 4 ヶ月で死亡するマウスが多くなるため、CD4+CD25-T 細胞移入マウスでは長期の抗核抗体の観察は困難であった。生存期間中は、継続して抗 RNP 抗体の産生を認めることができた。

##### (1-2) CD4T 細胞、CD4+CD25+T 制御性 T 細胞移入群

CD4T 細胞、CD4+CD25+T 制御性 T 細胞移入群では、抗核抗体を長期にわたり観察でき、少なくとも 8 ヶ月以上にわたり抗核抗体産生が認められた。CD4+CD25-T 細胞移入群で認めた腸炎による体重減少や死亡は認められなかった。

## (2) 抗 RNP 抗体産生への TLR の関与

細胞移入時およびその後各週ごとに、TLR7 と TLR9 それぞれに対する阻害 DNA をレシピエントに投与した。

抗 U1RNP-70K 抗体に関しては、コントロール DNA 投与群では一週目より徐々に抗体価が上昇していくが、TLR7 や TLR9 阻害 DNA 投与群では、当初より継続的に抗体価抑制効果を認めることができた。特に TLR7 阻害 DNA の投与の場合にその効果は顕著であり、細胞移入後 4 週間での抗 U1RNP-70K 抗体価は、コントロール DNA 投与の場合の約 23% と著明に抗体産生を抑制していた (図 1)。

抗 H+/K+ ATPase 抗体に関しては、TLR7 阻害 DNA の効果は乏しく、一方、TLR9 阻害 DNA 投与群では約 50% に抗体価が低下していた (図 2)。

抗 dsDNA 抗体や抗ヌクレオソーム抗体、抗 U1RNP-A 抗体、抗 U1RNP-C 抗体に関しては、現在検討中である。

## D. 考察

### (1) 抗 RNP 抗体産生への制御性 T 細胞の関与

ヌードマウスへの T 細胞サブセットの移入実験により、制御性 T 細胞は臓器特異的自己免疫疾患を抑制していることが知られている。この際に、抗 H+/K+ ATPase 抗体の産生も抑制していることから、制御性 T 細胞は自己抗体の産生も抑制している可能性が示唆されてきた。本実験でも、CD4T 細胞から CD4+CD25+制御性 T 細胞を除くことにより、抗 H+/K+ ATPase 抗体のみならず抗 dsDNA 抗体、抗ヌクレオソーム抗体の産生が誘導されたことから、制御性 T 細胞がこれら自己抗体産生を抑制していることを確認できた。しかし、抗 RNP 抗体に関しては、CD4T 細胞や制御性 T 細胞だけでも誘導できたことから、その産生制御における CD4+CD25+制御性 T 細胞の関与は少ないと考えられた。

### (2) 抗 RNP 抗体産生への TLR の関与

核酸蛋白複合体である RNP に対する自己抗体産生に、核酸受容体が関与しているかどうかを検討するために、RNA 受容体である TLR7、DNA 受容

体である TLR9 を阻害する DNA を本系に投与し、その後の抗 RNP 抗体の推移を検討した。TLR7 阻害 DNA 投与時に著明な抗 U1RNP-70K 抗体価の低下を認めたことより、TLR7 が抗 RNP 抗体産生過程に関わっていることが推測された。

TLR9 阻害 DNA でもある程度の抗 RNP 抗体産生抑制が認められたが、これに関しては、本実験では CD4+CD25-T 細胞を移入したため種々の自己抗体が産生されており、TLR9 も関与した抗原提示細胞の活性化や抗体産生が生じている可能性があると考えられた。

抗 RNP 抗体産生における TLR7 の関与に関して、選択的な関与なのか否かについては、現時点では不明な点が多い。しかし、抗 H+/K+ ATPase 抗体産生に関しては TLR7 阻害 DNA による影響をほとんど受けておらず、ある程度選択的に働いている可能性がある。

### (3) 本系の分子もしくは細胞標的治療開発への有用性について

本系は、抗核抗体の早期から長期にわたる簡便な誘導系であり、抗体やサイトカイン投与、移入 T 細胞の変更、レシピエントの変更など種々の誘導条件変更が可能である点が特徴である。従って、本系は、抗核抗体産生自己免疫疾患における分子標的治療もしくは細胞標的治療を開発する際に有用と考えられ、実際に今回の TLR に関する検討によりそれが示唆された。

MCTD では主体となる治療がステロイドであり、広範な副作用の可能性が常に存在し、肺高血圧症のように、治療困難な病態も存在している。そこで、本疾患の病態に基づいた治療の開発は重要な課題である。MCTD では抗 RNP 抗体の存在はその診断に欠かすことのできない重要な現象であり、その産生機序は深く本疾患の病態に関与していると考えられる。今回抗 RNP 抗体価を著明に低下させた TLR7 阻害が治療として有用かどうかは現時点では不明だが、その効果から今後の有用性の検討は、本疾患の分子標的治療の開発の観点からも充分意義あることと考えられる。



## E. 結論

抗 RNP 抗体は抗 H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 抗体や抗ヌクレオソーム抗体と異なり、その制御において制御性 T 細胞の関与は大きくはなかった。一方、本実験により、RNA 受容体である TLR7 は抗 RNP 抗体産生に強く関与し、その阻害により著明な抗 RNP 抗体産生抑制が得られることが示された。抗 RNP 抗体の存在は混合性結合組織病の疾患概念に密接に関連していることから、今後更に、TLR7 などの核酸受容体阻害の抗 RNP 抗体産生や自己免疫病態への効果につき検討を進めていくことは、本疾患の分子標的治療を開発する上でも意義があることと考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

本研究は、公表した段階で容易に類似の実験が可能になってしまうため、段階的な発表は控えた。現在用意している報告にて広く公表する予定である。

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

### 4. 特許取得

なし

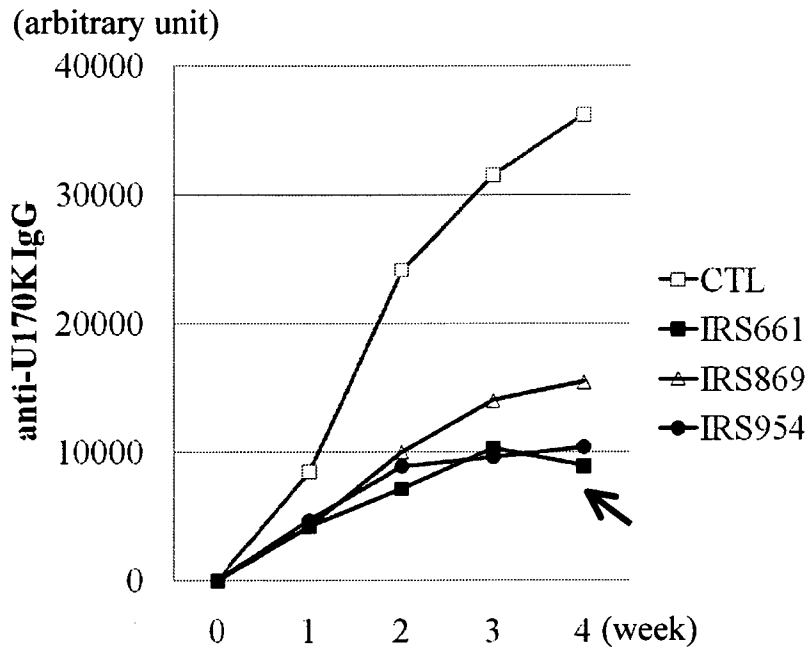
### 5. 実用新案登録

なし

### 6. その他

なし

图1

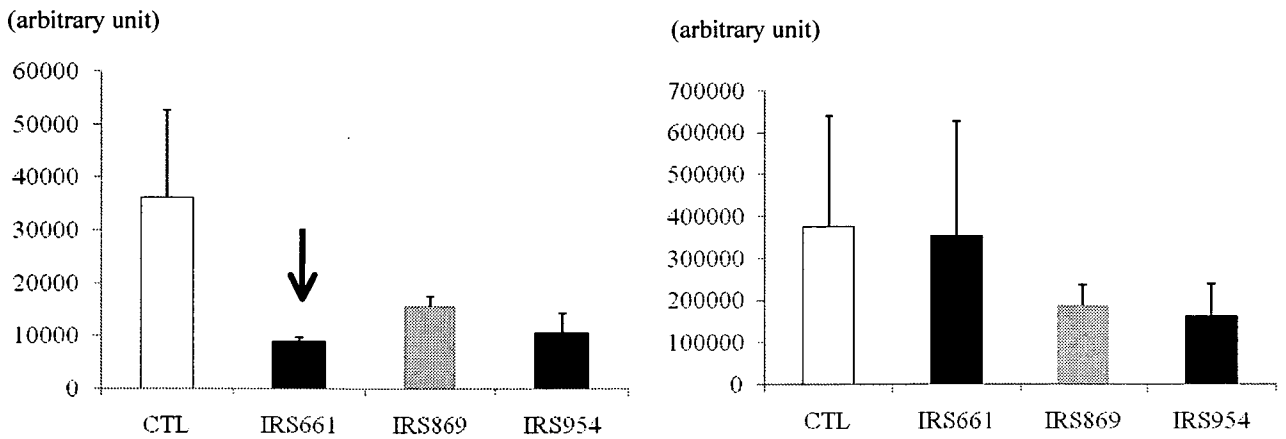


IRS 661 ; TLR7阻害、IRS 869 ; TLR9阻害、 IRS 954 ; TLR7/9阻害

图2

Anti-U1 70K IgG

Anti- H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase IgG



IRS 661 ; TLR7阻害、IRS 869 ; TLR9阻害、 IRS 954 ; TLR7/9阻害

**改良型抗核抗体測定用 ELISA の感度と特異度の検討**  
- MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm/SS-B/Jo-1 を中心に-

分担研究者： 三森 経世（京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・教授）  
研究協力者： 藤井 隆夫（京都大学大学院医学研究科内科学講座臨床免疫学・講師）  
小林 民雄、山下 雅樹、恒川 伸二、藤井 義久、清水 喜久男  
（株）医学生物学研究所

**研究要旨**

抗 U1RNP/Sm/SS-A/SS-B/Jo-1 抗体測定用 ELISA の有用性を調べた。抗 U1RNP 抗体、抗 SS-A 抗体については、MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト RNP/SS-A が特異度・感度ともに優れていたため、反応用緩衝液のみのマイナー変更であったが、MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト RNP/SS-A と同様の成績を示した。また MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Sm/SS-B/Jo-1 に比し、精製抗原の高純度化やリコンビナント抗原に加えて精製抗原を固相化した MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm/SS-B/Jo-1 では偽陽性例の頻度、「グレーゾーン」に分類される血清の頻度が少なくなった。今後発売される MESACUP<sup>®</sup>-3 Sm/SS-B/Jo-1 は、従来型の MESACUP<sup>®</sup>-2 テストに比してより特異性の高い抗核抗体測定法として有用と考えられる。

**A. 研究目的**

抗核抗体の測定は膠原病患者診療において必須である。抗U1RNP抗体は膠原病患者血清中で高頻度に検出される抗核抗体で、特にMCTDでは高力価である。また抗Sm抗体はSLEの疾患標識抗核抗体であり、アメリカリウマチ学会（ACR）の分類基準に含まれる。シェーグレン症候群（SjS）患者血清中には、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体が高頻度に検出されるが、特に抗SS-B抗体は一次性SjSに対する特異性が高く、二次性SjSや乾燥症状を欠く膠原病で検出は低率であると報告されている。さらに抗Jo-1抗体は、多発性筋炎（PM）/皮膚筋炎（DM）患者に特異的に見いだされる自己抗体であり、特に間質性肺炎の合併率が高くPM/DMの疾患標識抗体とされている。

これらの抗核抗体は患者の診断確定や治療法に影響を与えるため、感度および特異度の高い検査法の確立が望まれる。しかしこれまでのELISAによる測定結果には臨床所見とあわない偽陽性が少なからず認められていた。そこで本

研究では（株）医学生物学研究所が作成した抗U1RNP抗体および抗RNP/Sm/SS-A/SS-B/Jo-1抗体測定用ELISAキット（MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト RNP /Sm /SS-A /SS-B /Jo-1）の有用性を調べた。

**B. 研究方法**

厚生労働省 免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業「全身性自己免疫疾患における難治性病態の診断と治療に関する研究」（主任研究者：三森 経世 教授）の分担研究施設から供与された血清、（株）医学生物学研究所所有の血清並びに検診血清を用いて、抗U1RNP抗体、抗Sm抗体、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体および抗Jo-1抗体を測定した。なおその測定方法は添付の使用方法に従った。

**1) 抗U1RNP抗体**

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト RNPと、その反応用緩衝液のみを変更したMESACUP<sup>®</sup>-2 テスト RNP

(マイナー変更品) とで、その結果の相関を調べた。

## 2) 抗Sm抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Smは精製されたSm-D抗原を固相化していたが、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Smでは、その精製Sm-D抗原に含まれる31kDaの夾雑物と結合しているRNAを除去した上で固相化した。抗Sm抗体の測定については、二重免疫拡散法 (DID)、ウェスタンブロット法 (WB)、RNA-免疫沈降法 (RNA-IPP) の成績と比較した。また健診で集めた健常人血清中の抗Sm抗体を測定し、特に高力価となった血清についてMESACUP<sup>®</sup>-2/3テスト Smの成績を比較した。

## 3) 抗SS-A抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-Aと、その反应用緩衝液のみを変更したMESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-A (マイナー変更品) とで、その結果の相関を調べた。

## 4) 抗SS-B抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-BはリコンビナントSS-B抗原のみを固相化していたが、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト SS-Bでは、抗原活性を高めたリコンビナント抗原に新たに精製SS-B抗原を混合し固相抗原としている。抗SS-B抗体については、DIDの成績と比較した。また健診で集めた健常人血清中の抗SS-B抗体を測定し、平均値、SDおよび平均値+3SDを算出した。また、測定値が±領域となる頻度を比較した。

## 5) 抗Jo-1抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Jo-1はリコンビナントJo-1抗原を固相化していたが、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Jo-1では、ウサギ胸腺から精製したJo-1抗原とリコンビナントJo-1抗原を混合し固相化している。

これらELISAキットとDID、WBの成績を比較した。また健診で集めた健常人血清中の抗Jo-1抗体を測定し、特に高力価となった血清についてMESACUP<sup>®</sup>-2/3テスト Jo-1の成績を比較した。

## C. 研究結果

### 1) 抗U1RNP抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2テスト RNPとそのマイナー変更品を用いて対象血清を測定したところ、相関係数は0.9862であり低抗体価から高抗体価の血清まで、きわめて強い相関が認められた (データは示していない)。

### 2) 抗Sm抗体

対象血清をMESACUP<sup>®</sup>-2および3テスト Smで測定したところ、相関係数は0.8792と良好であった。しかし特に低力価 (<90 index) を示した血清で両者の抗体価の乖離が多く認められた。これらの血清の大部分ではMESACUP<sup>®</sup>-2テスト Smでは高力価であるが、MESACUP<sup>®</sup>-3テスト Smでは低力価とされた検体が多かった。さらに詳細に検討したところ、MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Smで、抗Sm抗体は陽性と判断されていながらMESACUP<sup>®</sup>-2 テスト RNPでは抗U1RNP抗体陰性と判断される抗Sm抗体偽陽性例が含まれていた。一方でMESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Smで測定した抗Sm抗体価は低く抑えられており、ほぼすべてが陰性 (<7 index)あるいはグレーゾーン (7-30 index) と判断され、陽性例 (>30 index) はなかった (データは示していない)。

さらに、DID、WB、RNA-IPPとELISAの結果を比較した (図1)。DID/WBともに陰性と判断された血清でもMESACUP<sup>®</sup>-2テスト Sm陽性の例が少なからず認められたのに対して、MESACUP<sup>®</sup>-3テスト Smではすべて陰性 (<30 index) と判定された。またDID/WBで陽性と判断された例、RNA-IPP陽性例は両方のキットともに偽陰性例が認められなかった。

健診で採取された健常者血清を用いてMESACUP<sup>®</sup>-2および3テスト Smで、抗Sm抗体を測定した (図2)。MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Smで測定した抗Sm抗体高力価上位20血清をMESACUP<sup>®</sup>-3テスト Smで測定したところ、すべて陰性 (<7 index) と判定された。またMESACUP<sup>®</sup>-3テスト Smで測定した抗Sm抗体高力価上位20例はグレーゾーン判定が1例にあってのみで他は陰性と判定されていた。

### 3) 抗SS-A抗体

MESACUP<sup>®</sup>-2テスト SS-Aとそのマイナー変更品を用いて対象血清を測定したところ、相関係

数は0.9803であり低抗体価から高抗体価の血清まで、きわめて強い相関が認められた（データは示していない）。

#### 4) 抗SS-B抗体

対象血清をMESACUP<sup>®</sup>-2および3テストSS-B(以下M-2 SS-B、M-3 SS-B)で測定したところ、相関係数は0.9691と良好であった。M-2 SS-BおよびM-3 SS-Bでの判定乖離例(両キットともに基準値 Index値 15未満 陰性、15以上、25未満 ±領域、25以上 陽性)は、対象血清591例、検診血清449例 合計1040例中30例であった(表1)。M-2 SS-B弱陽性4例は、M-3 SS-Bで3例が±領域、1例が陰性となり、M-2 SS-B±領域、35例は、M-3 SS-Bでは1例が陽性(DID 抗SS-B抗体陽性)、±領域が9例、25例が陰性となった。また健診で採取された健常者血清を用いてM-2 SS-BおよびM-3 SS-Bで、抗SS-B抗体を測定した(図3)。M-2 SS-BおよびM-3 SS-B 共に陽性となった検体1例(DID 抗SS-B抗体陽性)を除いた測定値の平均値、SD、平均+3SDは、M-2 SS-Bでそれぞれ4.2、3.0、13.2、M-3 SS-Bでそれぞれ、1.3、1.5、5.9 となった。

#### 5) 抗Jo-1抗体

研究班の検体をMESACUP<sup>®</sup>-2および3テストJo-1で測定したところ、相関係数は0.9754と良好であった(図4)。低力価を示した血清で両者の抗体価の乖離がいくつか認められた。これらの血清はMESACUP<sup>®</sup>-2テスト Jo-1では高力価であるが、MESACUP<sup>®</sup>-3テスト Jo-1では低力価の検体が多かった。これらは、臨床的には低力価が妥当と考えられた。

さらに、研究班の検体と(株)医学生物学研究所所有の検体で、DID、WBの結果を比較した(図5)。DID/WBともに陰性と判断された血清でもMESACUP<sup>®</sup>-2/3テスト Jo-1陽性の例が少なからず認められた。しかし、これらの検体の多くはMESACUP<sup>®</sup>-2と比較してMESACUP<sup>®</sup>-3テストでは、低力価を示した。またDID/WBで陽性と判断された例は両方のキットともに偽陰性例が認められなかった。

健診で採取された健常者血清449例を用いてMESACUP<sup>®</sup>-2および3テスト Jo-1で、抗Jo-1抗

体を測定した(図6)。MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Jo-1で高力価だった20例は、MESACUP<sup>®</sup>-3テスト Jo-1では、1例のみグレーゾーン(9-18 index)と判定され、19例は陰性(<9 index)と判定された。またMESACUP<sup>®</sup>-3テスト Jo-1で高力価だった20例もグレーゾーン判定が1例にあったのみで他は陰性と判定されていた。

#### D. 考察

抗U1RNP抗体および抗Sm抗体を測定するELISA(MESACUP<sup>®</sup>-2テスト RNP/Sm)は、保険適応があるため臨床の現場で多用されている。DIDも保険適応があるが、測定感度が低く、最近ではほとんどの検体がELISAにより判定されているものと考えられる。MESACUP<sup>®</sup>-2テスト RNPは、特異度・感度ともに優れている一方、MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Smで測定された抗Sm抗体の結果はしばしば臨床症状との乖離があり、あらためてDIDやRNA-IPPで測定し直す必要性があった。特に抗Sm抗体はSLEの疾患標識抗核抗体であるために、抗Sm抗体偽陽性例を、そのELISAの結果のみでSLEと診断してしまう可能性が危惧されていた。今回検討したMESACUP<sup>®</sup>-3テスト Smは、その固相化抗原の純度を高めることによって、よりDIDやRNA-IPPの結果との乖離が少なくなったと考えられる。今回の結果からMESACUP<sup>®</sup>-3テスト SmはMESACUP<sup>®</sup>-2テスト Smに比し、特異度が高まったと考えられる。

抗SS-A抗体の対応抗原は、60kDa(Ro)蛋白質と52kDa(Ro)蛋白質とされているが、60kDa(Ro)蛋白質がhY-RNAsと複合体を形成することで抗原活性が増強するとされている。MESACUP<sup>®</sup>-2テスト SS-Aは60kDa(Ro)蛋白質-hY-RNAs複合体を抗原とするため、従来から臓器から精製した抗原を使用している。一方、MESACUP<sup>®</sup>-3 SS-Bは、感度および特異性を高めるためリコンビナント抗原の抗原活性を高めた上で、新たに臓器からの精製SS-B蛋白質を混合し固相用抗原とした。SS-B抗原は50kDa(La)蛋白質で、翻訳後修飾を受け高度にリン酸化されており、少なくとも8種類のアイソフォームが存在するとされている。抗

Sm抗体の主要対応抗原Sm-D蛋白質も翻訳後修飾でアルギニン残基がメチル化され、抗原性が発現することが明らかになっている。50kDa (La)蛋白質の翻訳後修飾が抗原性に影響を与えているという報告はないが、固相化抗原に精製SS-B蛋白質を混合することでより感度・特異性が向上することが確認された。すなわち今回の検討で健常者血清の測定値平均+3SDが13.2 から5.9 と明らかに低下し、±の出現頻度も、全1040例で35例から12例と約1/3となった。M-2 SS-B 陽性、M-3 SS-B陰性1例は、DID法抗SS-B抗体陰性で抗SS-A抗体陰性であった。M-2 SS-Bで±領域・DID法抗SS-B抗体陽性の1例が、M-3 SS-Bで明らかな陽性となった。1例のみの改善で明確ではないが、感度の向上に臓器からの精製抗原が寄与している可能性がある。

MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Jo-1は、特異度・感度ともに優れている一方、MESACUP<sup>®</sup>-2テスト Jo-1で測定された抗Jo-1抗体の結果はしばしば臨床症状との乖離があった。特に抗Jo-1抗体はPM/DMの疾患標識抗体であるために、抗Jo-1抗体偽陽性例を、そのELISAの結果のみでPM/DMと診断してしまう可能性が危惧されていた。今回検討したMESACUP<sup>®</sup>-3テスト Jo-1は、固相化抗原にウサギ胸腺からの精製抗原を混合されており、また、リコンビナント抗原の精製度も向上している。そのため、健常者検体で認められる非特異反応が軽減されている可能性が示唆され、その結果より健常者での乖離が少なくなったと考えられた。今回の研究に用いられた臨床検体においてもMESACUP<sup>®</sup>-2および3テストで陽性となった検体で、DID/WBともに陰性とな

った検体が認められたが、MESACUP<sup>®</sup>-3テストがより低値を示しており、同様に非特異反応が軽減していた。MESACUP<sup>®</sup>-2テストではDIDとの比較で特異度・感度が最も高くなるように陽性域を設定されている。MESACUP<sup>®</sup>-3テストでもこれと同じ値が陽性域とされているが、明確な臨床的陽性域の確定のため、より確実な臨床的なカットオフ値の検討が必要である。

以上の通り、MESACUP<sup>®</sup>-2テストで問題となっていた点が改良され、MESACUP<sup>®</sup>-3テストでは特異性が高くなった。特に抗Sm抗体、抗SS-B抗体、抗Jo-1抗体はグレーゾーンに含まれる検体が少なくなり、疾患の診断に関してより有用な情報提供が可能になったと考えられる。

#### **E. 結論**

MESACUP<sup>®</sup>-2テストと同様、MESACUP<sup>®</sup>-3テストは抗核抗体の測定にきわめて有用である。特にMESACUP<sup>®</sup>-2テスト Sm/SS-B/Jo-1に比し、MESACUP<sup>®</sup>-3テスト Sm/SS-B/Jo-1の特異性の向上が確認された。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

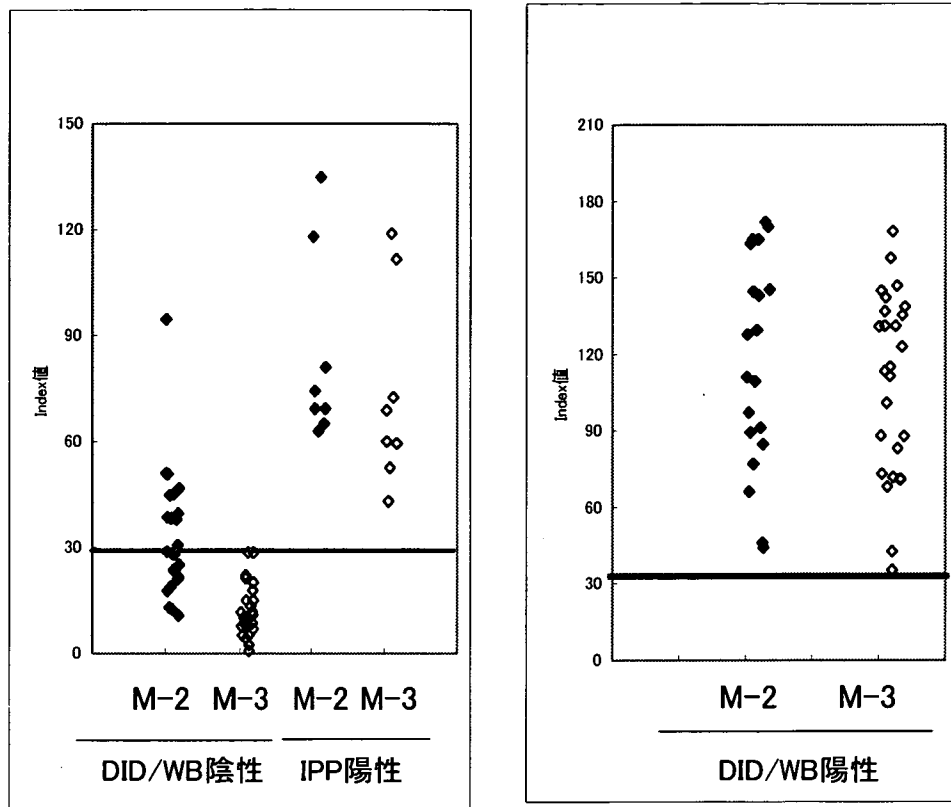


図 1. DID/WB/RNA-IPP と MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Sm との比較

DID/WB 陰性例でも MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Sm (M-2) では陽性となる症例が認められた。一方で MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm (M-3) ではいずれも陰性と判定された。また RNA-IPP あるいは DID/WB が陽性の場合には MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Sm とともに陽性と判定された。

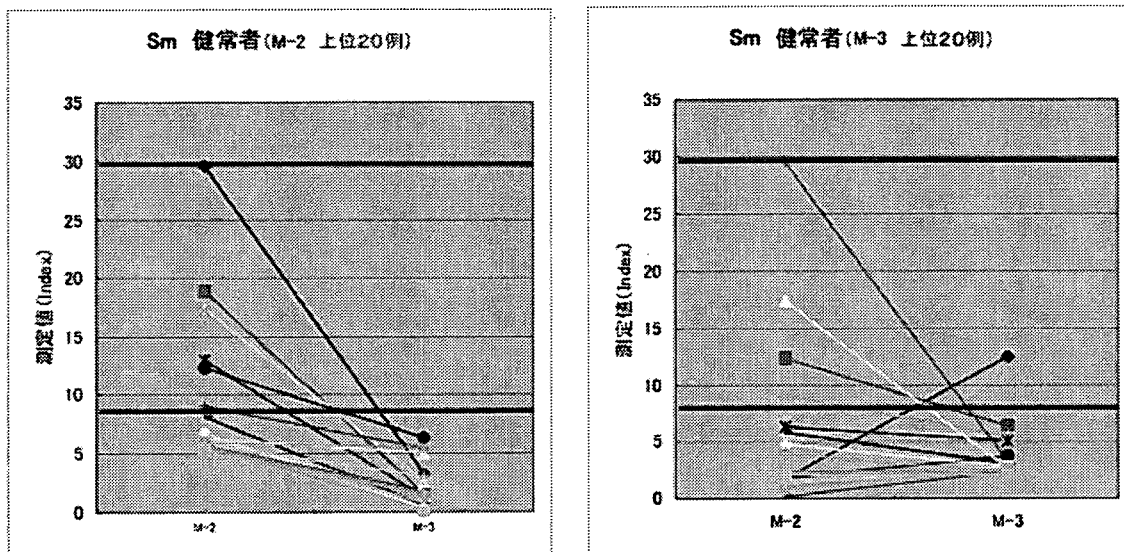


図 2. 健診（健常人）検体を用いた MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Sm の検討

左に示すように、MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Sm (M-2) では比較的高力価であった（偽）陽性—グレーゾーン症例も MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm (M-3) では陰性 (<7 index) と判定された。また MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Sm (M-3) で測定した健常人の抗 Sm 抗体価は 1 例でグレーゾーン (7-30 index) と判定された以外はいずれも陰性であった。

SS-B		MESACUP-3テスト SS-B			例数 合計
		陽性	±領域	陰性	
MESACUP-2テスト SS-B	陽性	33	3	1	37
	±領域	1 *	9	25	35
	陰性		0	968	968
合計		34	12	994	1040

基準値 Index		
	SS-B	SS-A
陽性	>25	>30
±領域	15-25	10-30
陰性	<15	<10

表 1. MESACUP<sup>®</sup>-2 および 3 テスト SS-B の判定比較

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-B の±領域の出現数は、35 例であったが、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト SS-B では 12 例となった。

\* MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-B ±領域、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト SS-B 陽性例は、DID 法抗 SS-B 抗体陽性であった。



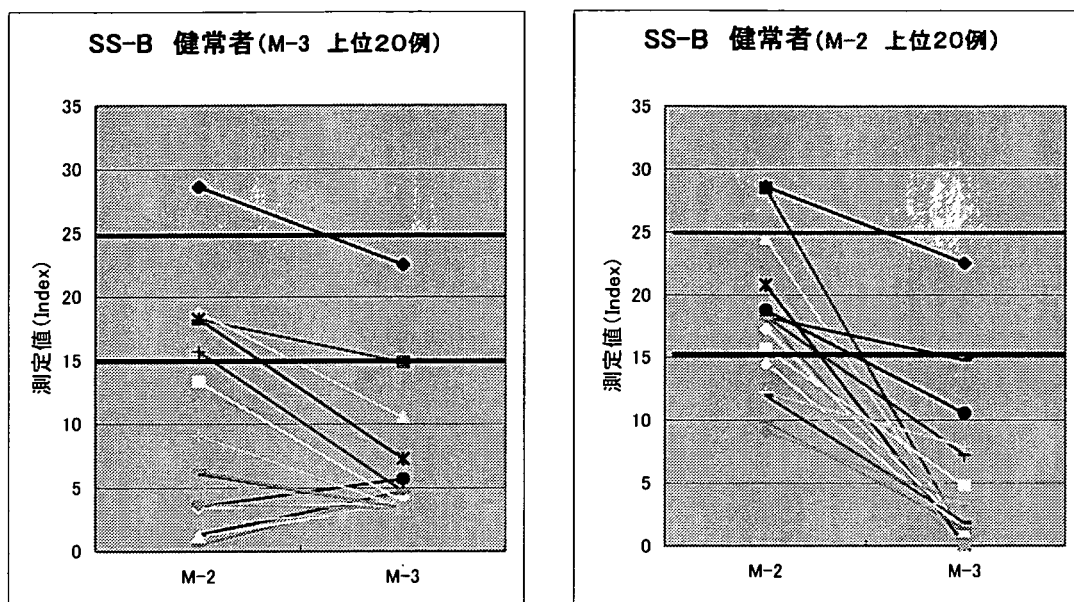
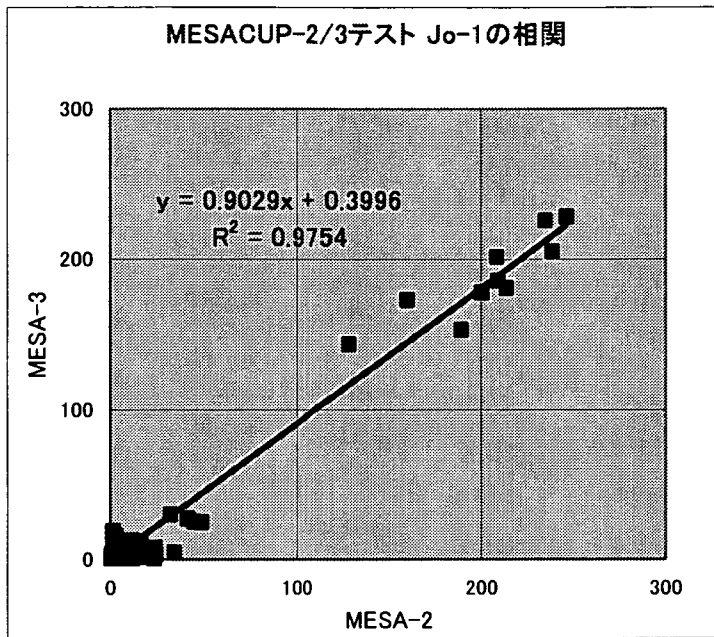


図3. 健診（健常人）検体を用いた MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト SS-B の検討

左に示すように、MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト SS-B (M-2) では比較的高力価であった（偽）陽性～±領域症例も MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト SS-B (M-3) では陰性 (<15 index) と判定された。また MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト SS-B (M-3) で測定した健常人の抗 SS-B 抗体価は 1 例で±領域（15-25 index）と判定された以外はいずれも陰性であった。



**図 4. MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Jo-1 の相関**

MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Jo-1 (MESA-2) と MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Jo-1 (MESA-3) の相関係数は 0.9754 と良好であった。低力価を示した血清で両者の抗体価の乖離がいくつか認められた。これらの血清は MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Jo-1 では高力価であるが、MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Jo-1 では低力価の検体が多かった。

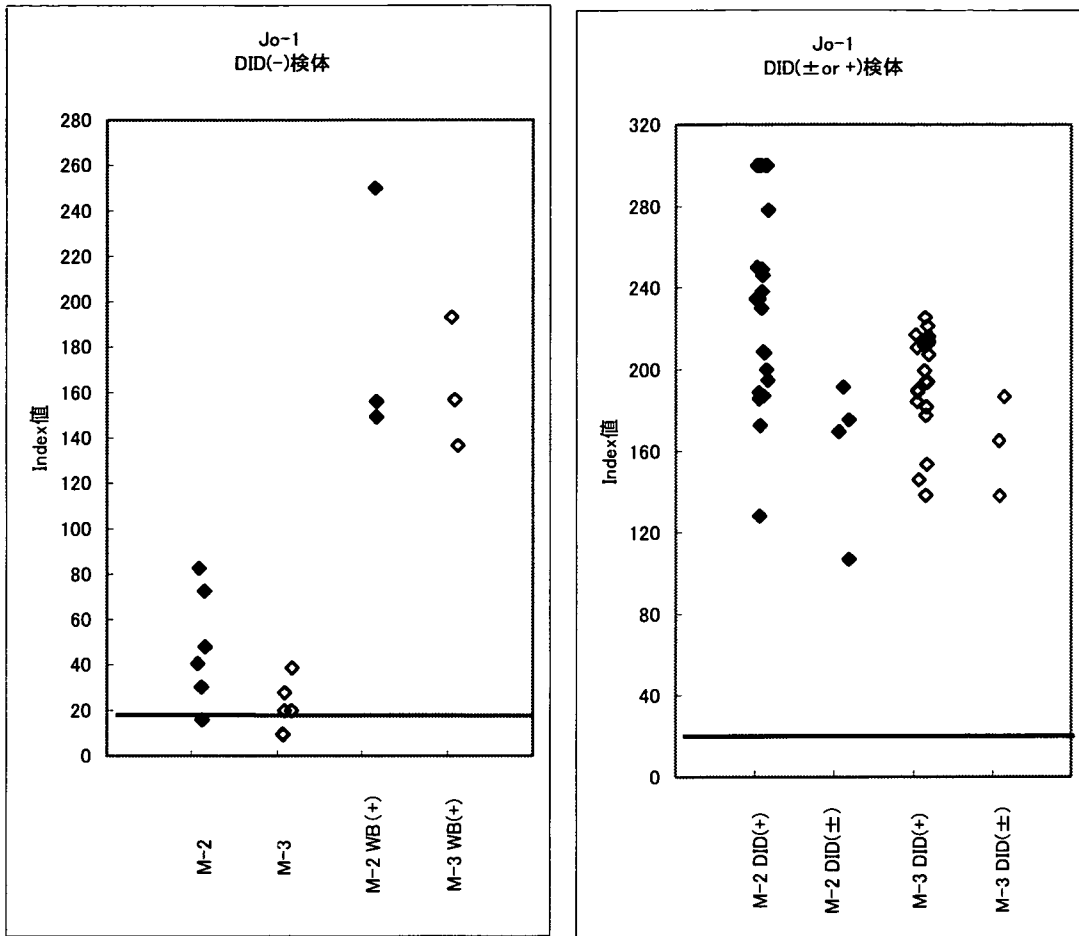


図 5. DID/WB と MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Jo-1 との比較

DID/WB 陰性例でも MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Jo-1 (M-2) では陽性となる症例が少なからず認められた。しかし、MESACUP<sup>®</sup>-2 と比較して MESACUP<sup>®</sup>-3 テストでは、低力価を示した。また DID/WB で陽性と判断された例は両方のキットともに偽陰性例が認められなかった。

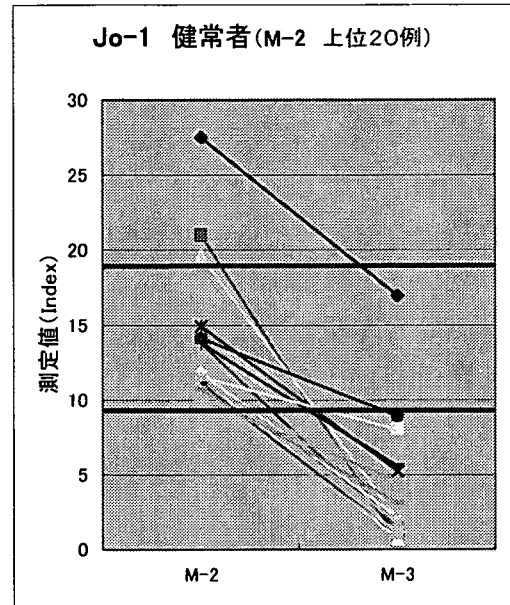
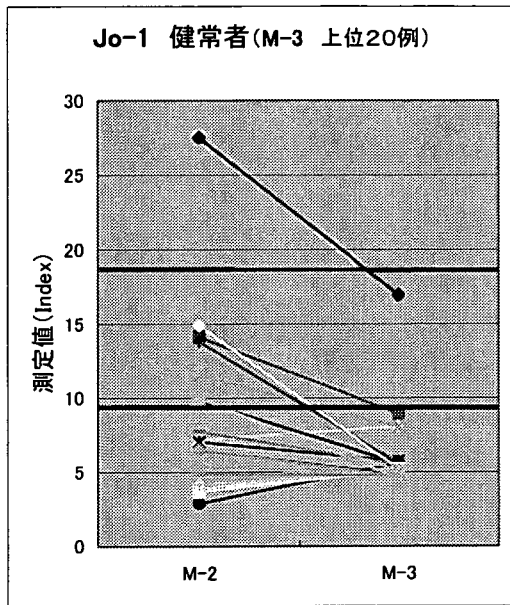


図6. 健診（健常人）検体を用いた MESACUP<sup>®</sup>-2/3 テスト Jo-1 の検討

左に示すように、MESACUP<sup>®</sup>-2 テスト Jo-1 (M-2) では比較的高力価であった（偽）陽性－グレーゾーン症例も MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Jo-1 (M-3) では1例のみグレーゾーン（9-18 index）と判定され、19例は陰性（<9 index）と判定された。また MESACUP<sup>®</sup>-3 テスト Jo-1 で比較的高力価であった（偽）陽性－グレーゾーン症例も上位20例はグレーゾーン判定が1例にあったのみで他は陰性と判定された。